

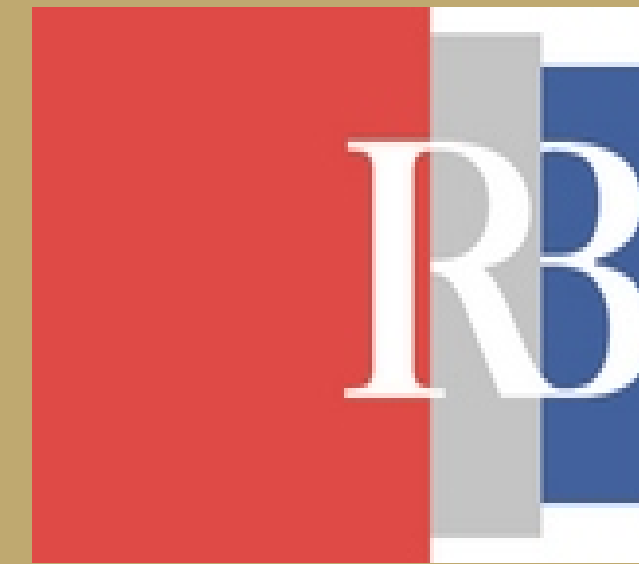
DRVO ŽIVOTA

Upoznajte streptomicete ...

T. Paradžik¹, Ž. Filić¹, A. Bielen²

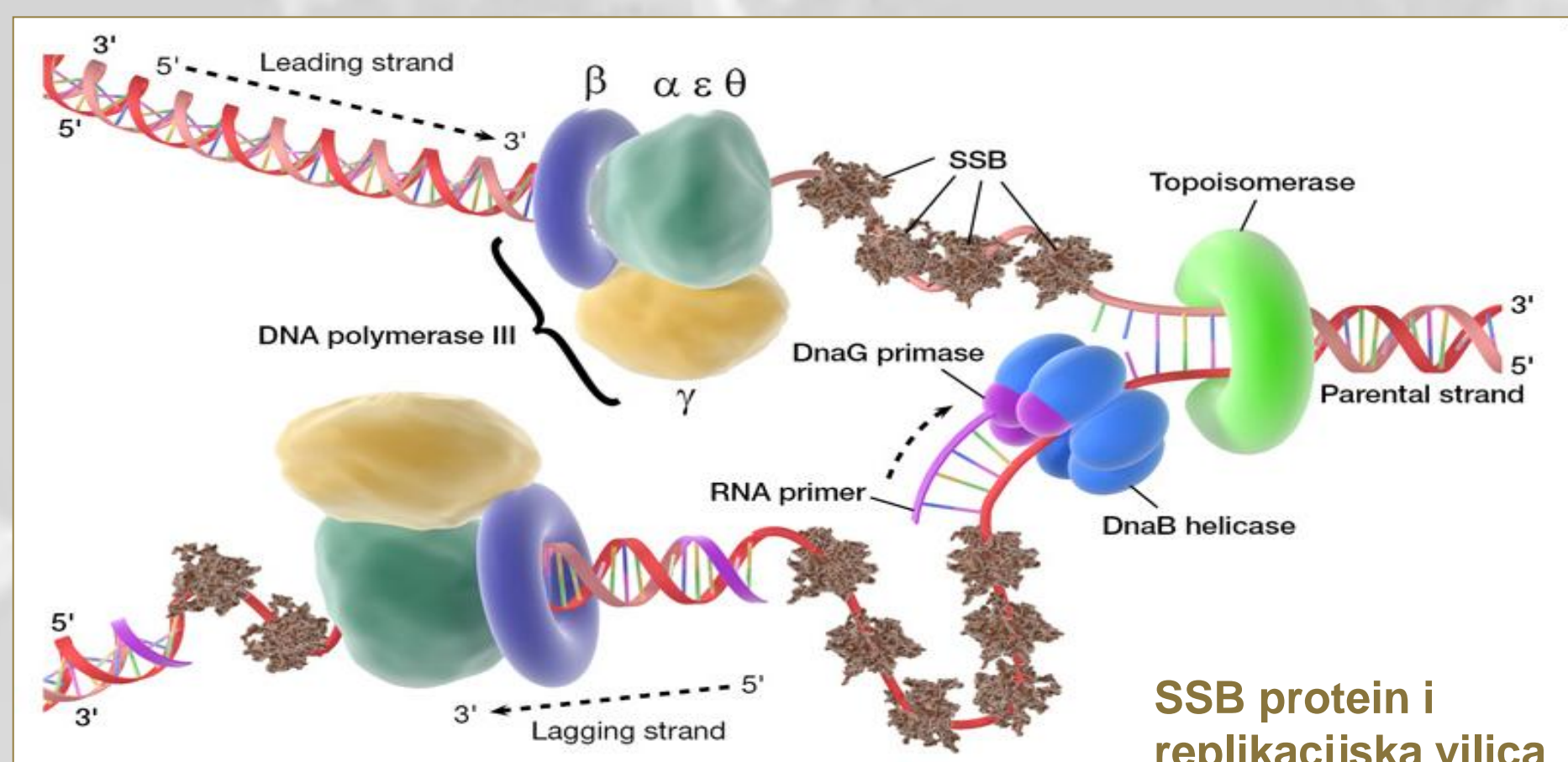
¹Laboratorij za molekularnu genetiku, Zavod za molekularnu biologiju, Institut Ruđer Bošković

²Laboratorij za biologiju i genetiku mikroorganizama, Zavod za biokemijsko inženjerstvo, Prehrambeno - biotehnoški fakultet



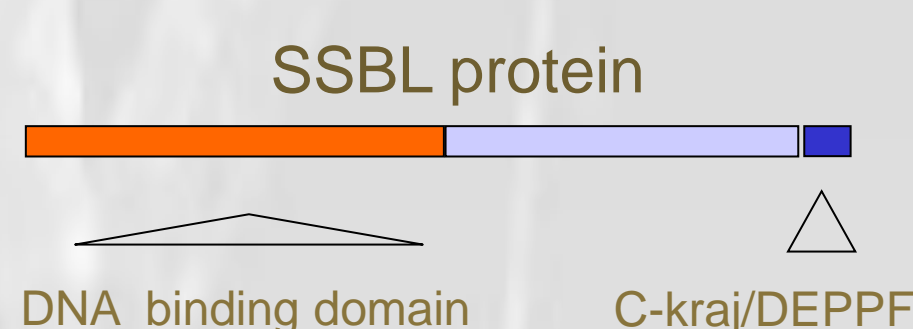
... od glave

SSB proteini (single stranded DNA binding proteins)
- esencijalni stanični proteini za procese DNA metabolizma

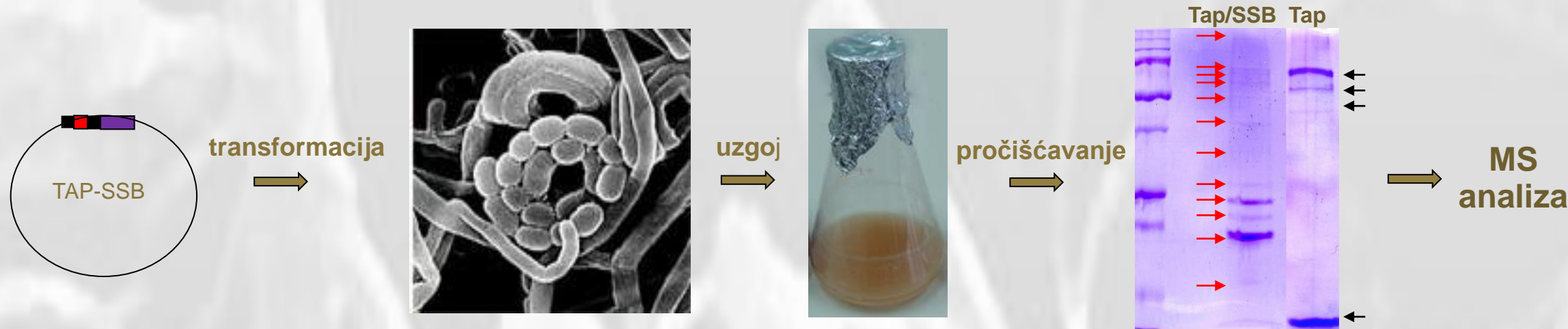
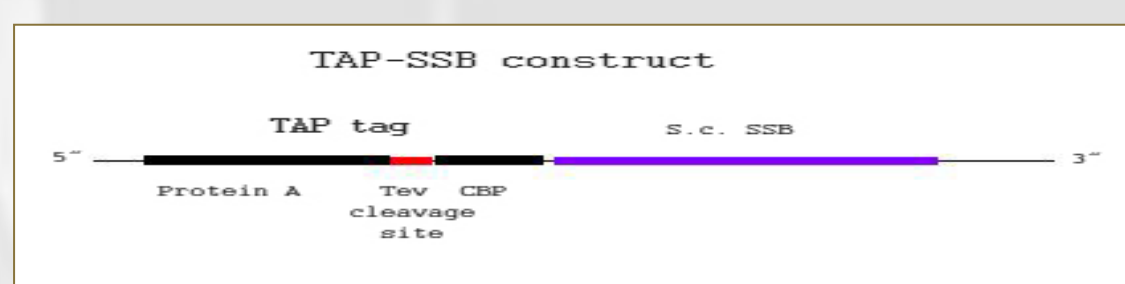


TAP-tehnologija

za identifikaciju proteina koji stvaraju komplekse



Genetička konstrukcija SSBL proteina, TAP-tag i pročišćavanje proteinskih kompleksa

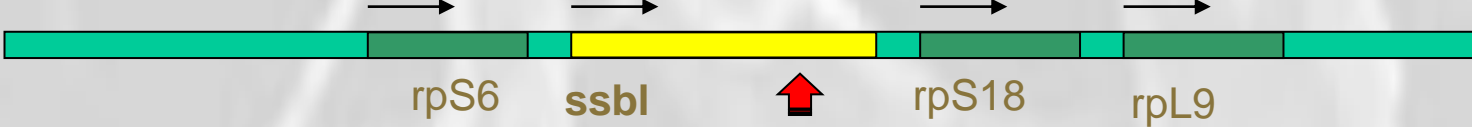


Rezultati analize masene spektrometrije
(proteini u interakciji sa SSBL proteinom ?)

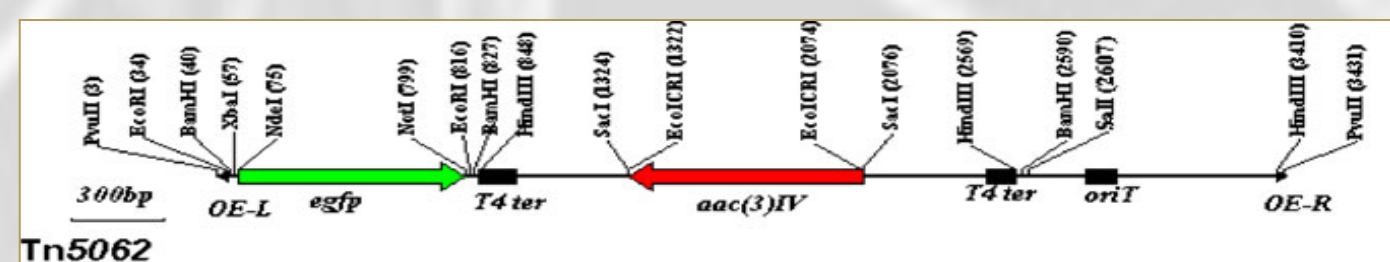
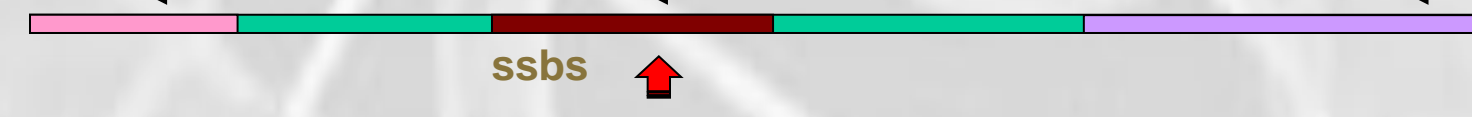
| DNA metabolizam | Translacija | Transkripcija | Hipotetski proteini | Druge funkcije |
|--------------------------------|-----------------|--|---------------------|--------------------------|
| ATP-ovisna DNA helikaza / RecG | 2 nova proteina | RNA polimeraza β' podjedinica (u tijeku je kloniranje) | 6 novih proteina | Molekularni šaperon DnaK |
| DNA topoisomeraza I | | 6 novih proteina | | 12 novih proteina |
| Rekombinaza A | | | | |
| RecQ helikaza | | | | |
| + 12 novih proteina | | | | |

Bakterija *Streptomyces coelicolor* ima linearni kromosom veličine 8 667 507 parova baza, na genomu se nalaze 2 gena koji kodiraju za SSB

ssbl – pozicija na kromosomu 4 303 613 - 4 304 212 pb

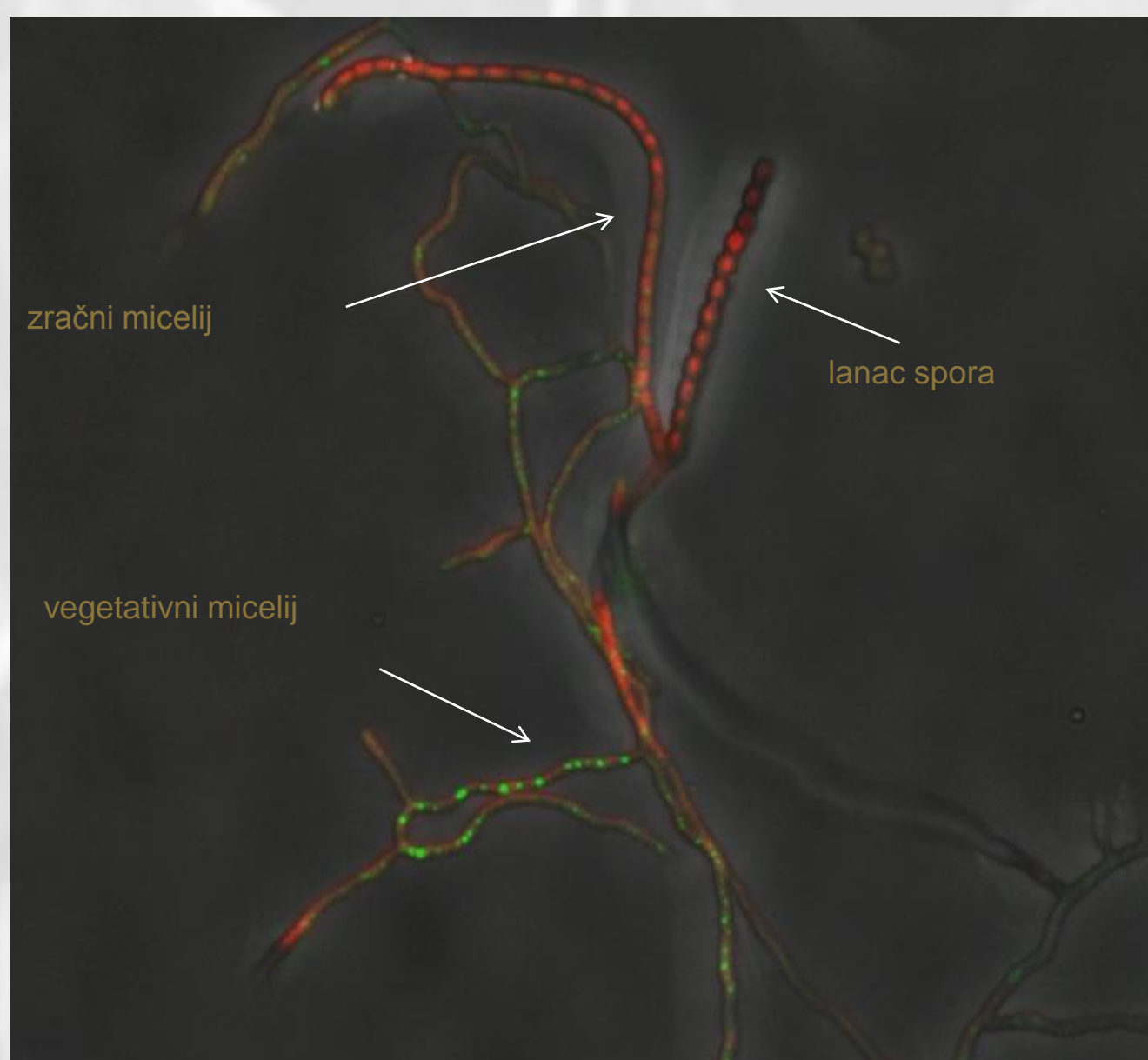


ssbs - pozicija na kromosomu 2 924 515 - 2 924 985 pb



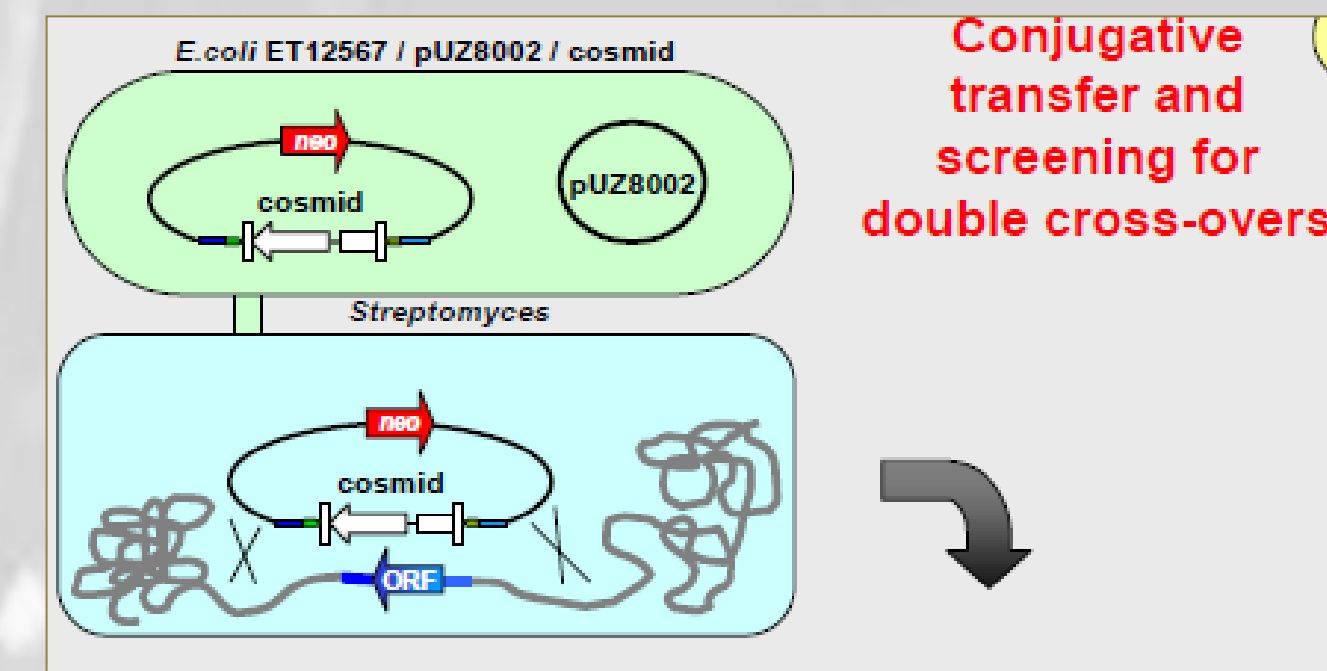
Inaktivacija ssb gena pomoću transpozona Tn5062 -

Obilježavanje SSBL proteina s GFP i njegova lokalizacija u hifama bakterije *S. coelicolor*



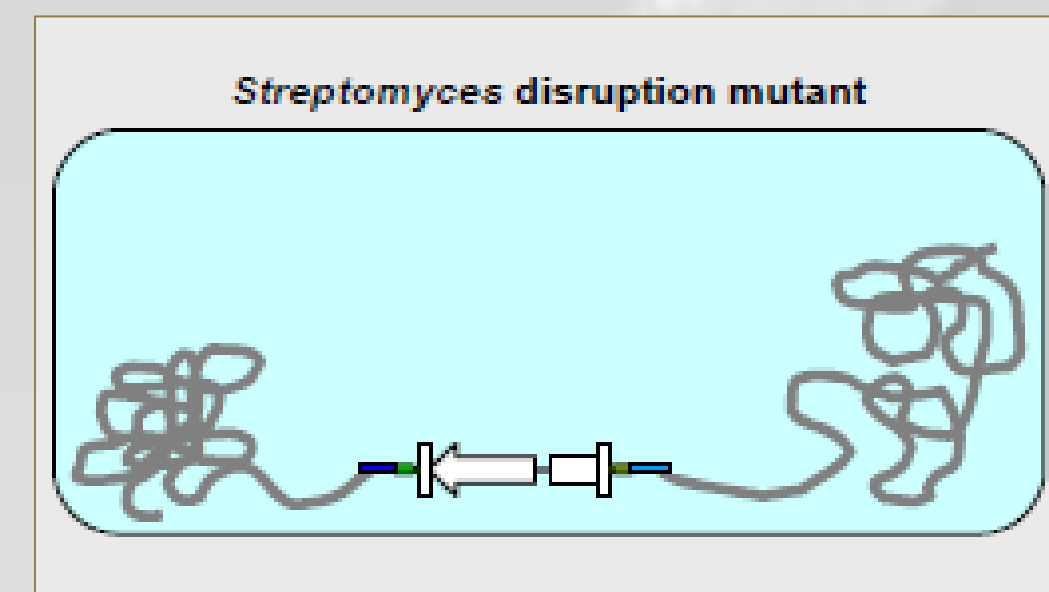
Crveno: DNA obojana sa bojom Syto42
Zeleno: SSB protein obilježen zelenim fluorescentnim proteinom (GFP)

Prijenos kozmida konjugacijom iz bakterije *E. coli* u bakteriju *S. coelicolor*



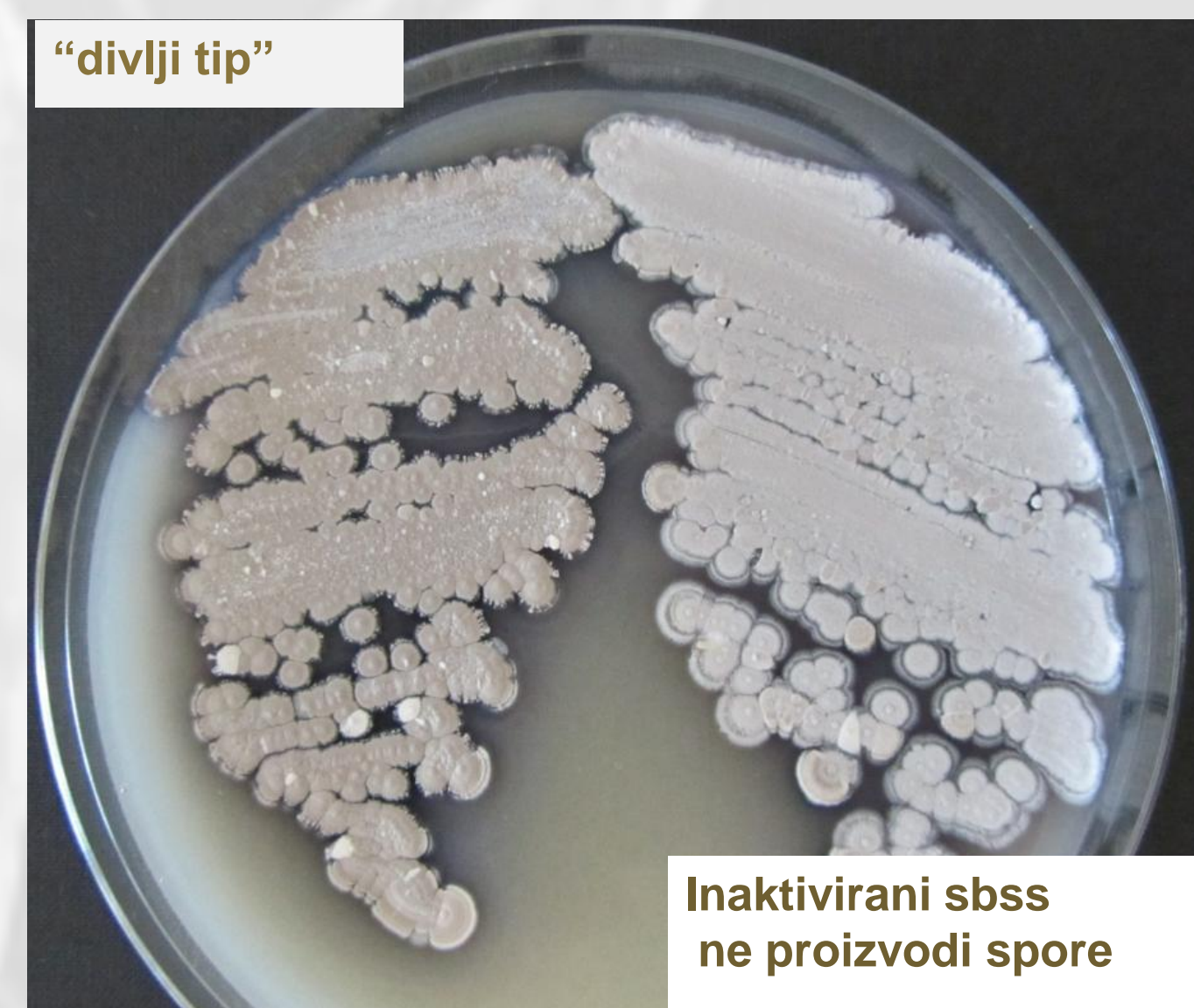
Kako se dobivaju mutacije u željenom genu ?

Rekombinacijom kozmida sa kromosomskom DNA i selekcijom rekombinantata pomoću antibiotika



Rezultati inaktivacije:

- **ssbl** - je esencijalan
- **ssbs** - nije esencijalan ali ne sporulira



U suradnji sa Laboratorijem za kemijsku i biološku kristalografiju (Institut “Ruđer Bošković”) riješena je i kristalna struktura SSB proteina.

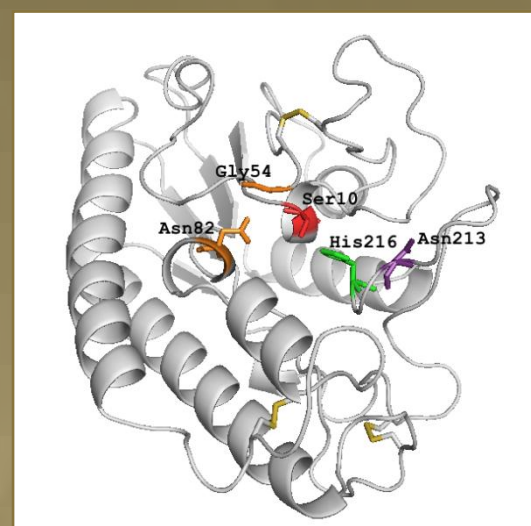
... do pete



4 x 10⁷ bakterijskih stanica u 1g tla!



STREPTOMICETI! Gram-pozitivne bakterije iz roda *Streptomyces*



Izlučuju korisne enzime - GDS(L) porodica lipolitičkih enzima!



Bogate mogućnosti primjene lipaza

Kako pronaći GDS(L) enzime?

Bionformatički pristup - pretraga baza podataka

Očuvani sljedovi aminokiselina (blokovi)...

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|------|----------|----|------|------|--------|-----|------|-----|--------|-----|------|-----|-----------|-----|
| SrL Q93MW7 | : 39 | VALGDSMS | 46 | ---- | 85 | ASSCAR | 90 | ---- | 111 | ITLGGN | 117 | ---- | 250 | NSYHETAN | 256 |
| ScL Q9S2A5 | : 39 | VALGDSMS | 46 | ---- | 85 | ASSCAR | 90 | ---- | 111 | ISTGGN | 117 | ---- | 250 | ESYHETAN | 256 |
| Sc2 Q93J06 | : 43 | VALGDSMS | 50 | ---- | 88 | TASSAR | 92 | ---- | 121 | LTTGGN | 127 | ---- | 275 | VPVHPNALS | 281 |
| Est P22266 | : 48 | VALGDSMS | 55 | ---- | 102 | SISGSL | 107 | ---- | 140 | GSLGGN | 146 | ---- | 322 | WYAHNDKAR | 328 |
| TAP P0ADA1 | : 31 | LILGDSMS | 38 | ---- | 67 | SISGDT | 72 | ---- | 94 | VELGGN | 100 | ---- | 183 | DGIHNRDAQ | 189 |
| | | v LGDSys | | | c Ga | | | | | GGND | | | | HP | g |

Blok I

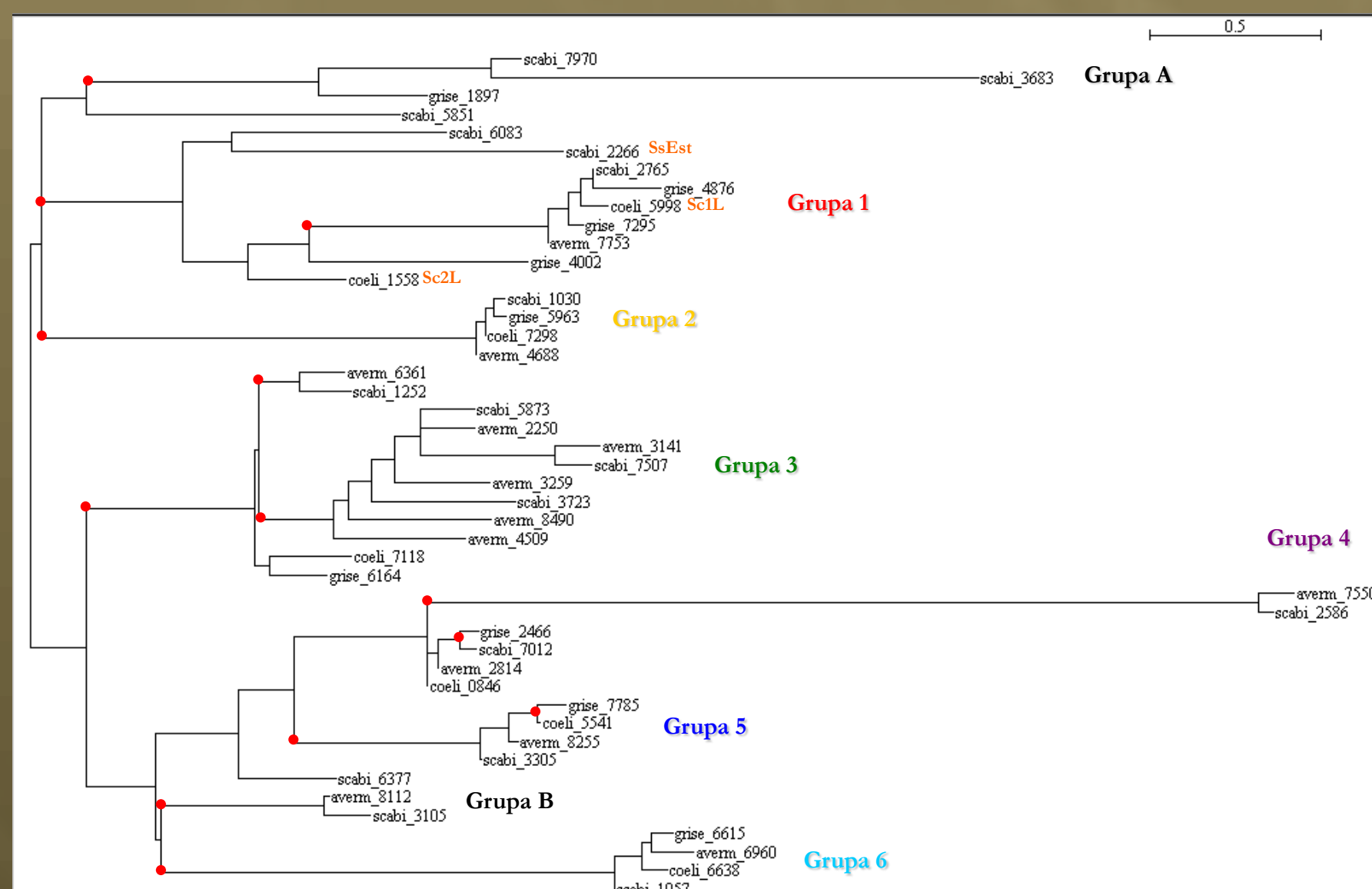
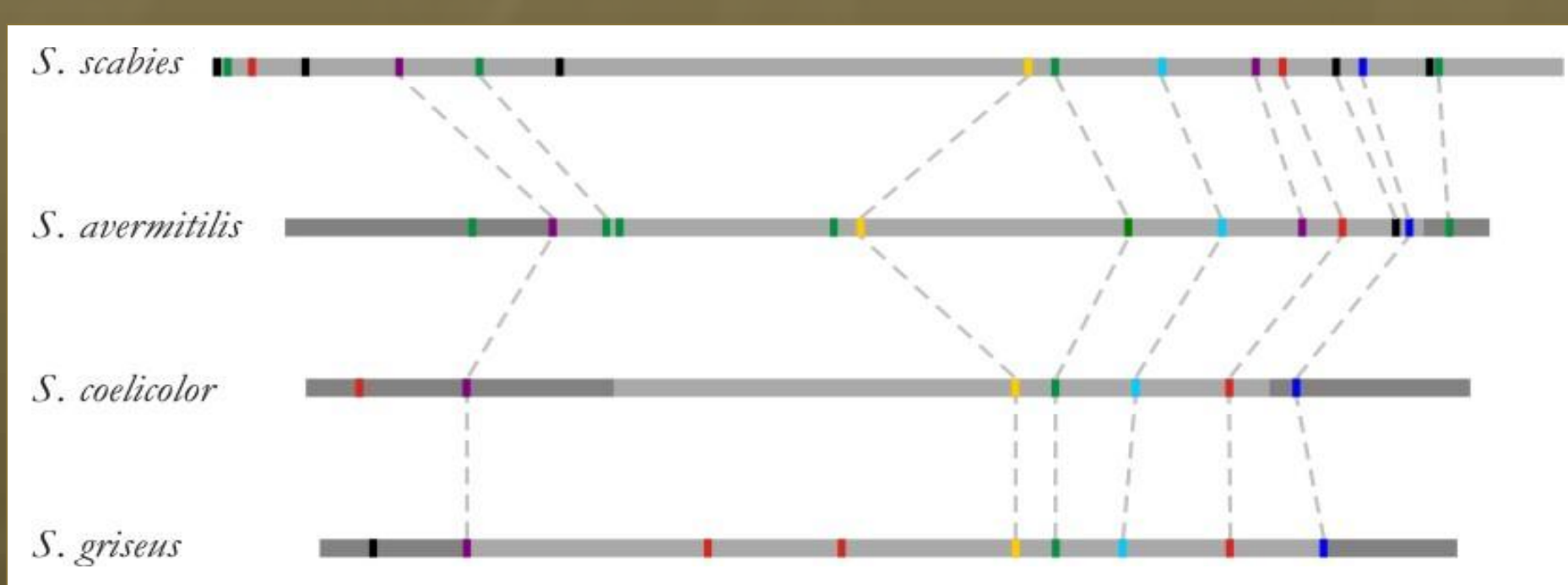
Blok II

Blok III

Blok V

Velik broj GDS(L) gena u genomima streptomiceta...

Sintenijska i filogenetska analiza



Određivanje svojstava GDS(L) lipaza iz bakterija *Streptomyces rimosus* (SrL) i *S. coelicolor* (Sc1L) ...

Koje su aminokiseline ključne za aktivnost?

- dirigena mutageneza

Kakva su fizičko-kemijska i biokemijska svojstva te mogućnosti primjene enzima?

| | SrL | Sc1L |
|--|-------------|-------------|
| Visoka optimalna temperatura za aktivnost | 55°C | 55°C |
| Stabilnost pri širokom rasponu temperature | 25°C - 50°C | 25°C - 55°C |
| T _m | 66,2°C | 66,6°C |
| Optimalni pH za aktivnost | 9,5 | 8 |
| Stabilnost pri širokom rasponu pH | 4 - 10 | 4-9,5 |
| Mr | 27,5 kDa | 25,3 kDa |
| pI | 8,45 | 7,45 |

| Supstrati | Sc1L i SrL |
|---------------------|---|
| p-nitrofenil esteri | SrL je najaktivnija prema supstratima sa C8 do C12 lancima, a Sc1L C12 do C16 |
| naftil esteri | |
| ulja | razgrađuju širok raspon različitih prirodnih ulja |
| tween detergents | Tween 20 – Tween 80 |
| triacilgliceroli | triolein |

- razgradnja različitih supstrata

Prikazani rezultati dio su projekta MZOŠ; 098-0982913-2877 "Temeljna molekularno-biološka istraživanja streptomiceta" pod vodstvom Dr.sc. Dušice Vujaklije, kojoj ovom prilikom zahvaljujemo na potpori i mentorstvu.